基础研究

人Bcl-6 3'UTR区报告质粒及其表达载体的构建和功能检测

韩白玉[1,2],崔瀚之[3],燕 翔[4],黄 鹏[5],黄华龙[5],范忠义[4],窦京涛[1]

解放军总医院[1]内分泌科,[4]肿瘤科,北京 100853;[2]北京军区第264医院内分泌科,山西 太原 030000;[3]解放军309医院肿瘤科,北京 100091;[5]解放军61213部队,山西 临汾 041000

摘要:目的 通过构建bcl-6基因野生型、突变体3'UTR区及其编码序列(CDS),观察miR-127对bcl-6的直接靶向调控作用及bcl-6表达载体回复miR-127抑制细胞周期和细胞生长的功能。**方法** 利用PCR方法扩增bcl-6基因3'UTR区序列及其CDS,分别构建在pcDNA3.0-Luc和pcDNA3.0-Flag载体上,在bcl-6基因3'UTR质粒基础上应用重组PCR方法构建miR-127结合位点突变的突变体报告基因质粒,应用荧光素酶报告基因系统检测miR-127对bcl-6的直接靶向调控作用,在肝癌细胞HepG2中检测过表达及敲低miR-127引起bcl-6基因表达抑制后细胞周期和细胞生长的改变,同时应用表达载体回复bcl-6蛋白水平,检测bcl-6在miR-127调控细胞周期和细胞生长中的必要性。**结果** 构建的重组质粒经酶切鉴定和测序证实构建正确,bcl-6 3'UTR野生型和突变体报告质粒与miR-127共转293T细胞和HepG2细胞后荧光素酶报告基因检测显示miR-127明显降低野生型报告质粒的活性,但对突变体活性没有影响,miR-127可引起HepG2细胞G2/M期阻滞并抑制细胞生长,bcl-6可以逆转miR-127对细胞周期和细胞生长的影响。**结论** 成功构建bcl-6基因3'UTR区野生型、突变体报告质粒和bcl-6基因的表达载体,荧光素酶报告基因和回复实验证实均具有生物学功能。

关键词: bcl-6基因;3'UTR区;荧光素酶报告基因;细胞周期

Construction of human Bcl-6 3'UTR reporter vector and expression vector and their functional assessment

HAN Baiyu[1,2], CUI Hanzhi[3], YAN Xiang[4], HUANG Peng[5], HUANG Hualong[5], FAN Zhongyi[4], DOU Jingtao[1]

[1]Department of Endocrinology, [4]Department of Medical Oncology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; [2]Department of Endocrinology, 264 Hospital of Beijing Military Command, Taiyuan 030000, China; [3]Department of Medical Oncology, 309 Hospital of PLA, Beijing 100091, China; [5]No.61213 Troop of PLA, Linfeng 041000, China

Abstract: Objective To observe the direct regulation of miR-127 on Bcl-6 and the effect of Bcl-6 in rescuing miR-127-induced cell cycle and cell growth inhibition. **Methods** The 3'UTR and coding region of human bcl-6 gene were amplified by PCR and cloned into pcDNA3.0-Luc and pcDNA3.0-Flag vectors, respectively. Mutations were introduced into the seed sequences of the predicted miR-127 target sites within the Bcl-6 3'UTR using recombinant PCR. Luciferase assay was used to verify the direct targeted regulation of miR-127 on Bcl-6. In HepG2 cell models with overexpression or knockdown of miR-12, the changes of cell cycle and cell growth were investigated after transfection with the constructed vectors. **Results** The recombinant plasmids were successfully obtained as confirmed by double digestion and sequence identification. Luciferase assay showed that in 293T and HepG2 cells, miR-127 inhibited the activation of wild-type Bcl-6 3'UTR reporter vector but not mutated Bcl-6 3'UTR vector. Overexpression of miR-127 induced cell cycle arrest at G_2/M phase and suppressed the growth of HepG2 cells, and these effects were reversed by Bcl-6 overexpression. **Conclusion** We successfully cloned wild-type and mutated 3'UTR reporter vectors and expression vector of bcl-6 gene and confirmed their biological functions.

Key words: bcl-6 gene; 3'UTR; luciferase reporter gene; cell cycle

Bcl-6蛋白和bcl-2蛋白同属于B淋巴细胞瘤蛋白家族,研究证明该家族基因主要参与细胞的凋亡过程,其中包括促进细胞凋亡的一组基因和抑制细胞凋亡的一组基因,bcl-6与bcl-2基因功能相似,在细胞的生理过程中发挥抑制凋亡的作用[2];不仅如此,bcl-6是一种转录抑制因子[3],其通过调控多种靶基因表达参与调控细胞的活化[4]、分化[5]和增殖[6]等过程;同时还参与细胞周期调控[7]及DNA损伤修复[8]。

近期研究发现,bcl-6基因除了与多种淋巴瘤密切相关外还与多种实体肿瘤的发生、发展密切相关,如乳腺癌[9-10]、多形性胶质母细胞瘤[11]、结肠癌[12]和胆囊癌[13]等。由于bcl-6在肿瘤发生发展中的作用被认识,其调控机制也成为研究中的热点。研究发现bcl-6表达不但受到转录因子[14]和细胞因子的调控[15],同时也受到

收稿日期:2015-01-15
基金项目:中国人民解放军第三〇九医院课题(2015MS-010)
作者简介:韩白玉,在读博士研究生,E-mail: bzy229@sina.cn;崔瀚之,硕士研究生,E-mail: 224tracy@sohu.com。崔瀚之、韩白玉共同为第一作者
通信作者:窦京涛,主任医师,博士生导师,E-mail: jingtaodou@163.com;范忠义,主治医师,博士,E-mail: fzyi11@163.com

miRNA的转录后调控,例如:miRNA-127[6]。但是现在发现的靶向bcl-6的miRNA还比较少,其调控网络有待于进一步研究充实。在miRNA研究中目的基因的3'UTR区报告质粒和表达载体必不可少。本实验中,我们通过基因克隆技术构建bcl-6基因的野生型3'UTR区报告质粒和bcl-6基因的表达载体,为下一步筛选新的直接靶向bcl-6的miRNA奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人胚肾293T细胞、人肝细胞癌HepG2细胞、pcDNA3.0-miR-127质粒、空载体pcDNA3.0-FLAG和pcDNA3.0-Luc由解放军总医院肿瘤内科保存,大肠杆菌感受态DH5α购自康为世纪生物科技有限公司。Prime STAR HS DNA Polymerase、限制性核酸内切酶(*Eco*RⅠ、*Xba*Ⅰ、*Kpn*Ⅰ、*Xho*Ⅰ)、T_4连接酶购自TaKaRa公司;真核细胞质粒小量提取试剂盒、荧光素酶报告基因底物为Promega公司产品;PCR产物琼脂糖凝胶回收试剂盒采购自北京天根生物科技有限公司;转染试剂VigoFect购自威格拉斯生物技术有限公司;兔抗人bcl-6单克隆抗体、兔抗人Cyclin D1单克隆抗体购自Abcam公司;兔抗人GAPDH单克隆抗体、辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔IgG购自Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶偶联的抗FLAG抗体购自Sigma公司;miR-127 inhibitor为Qiagen公司产品。测序由北京博迈德技术有限公司完成。引物合成来自北京赛百盛生物技术有限公司。其余化学试剂为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 bcl-6 3'UTR区及其表达载体重组质粒的构建 查询TARGET(www.targetscan.org)和PUBMED(www.pubmed.com)分别获得bcl-6 3'UTR区序列和bcl-6基因CDS区序列,设计并合成引物如下:bcl-6 3'UTR区:(上游)5'-<u>CGGAATTC</u>AGCATGGAGTGTTGATGCTTTCGTCTCCA-3';(下游)5'-<u>GCTCTAGA</u>CCAGTTTGACTTTTCAACATTTTATTCTTATA-3'。bcl-6表达载体:(上游)5'-<u>GGGGTACC</u>ATGGCCTCGCCGGCTGACAGCTGTATC-3';(下游)5'-<u>CCGCTCGAG</u>TCAGCAGGCTTTGGGGAGCTCCGGAG-3',突变体bcl-6 3'UTR区:(上游):5'-GACTCGAAGTGTCTGCCTGCAGATACAAAATCGAGCCT-3';(下游):5'-AGGCTCGATTTTGTATCTGCAGGCAGACACTTCGAGTC-3',下划线为酶切位点,加粗斜体为bcl-6 3'UTR突变位点(miR-127结合位点)。分别以乳腺基因组和乳腺文库为模板,应用PCR扩增上述两种目的片段,具体条件为:95 ℃ 5 min预解螺旋,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 3 min,共32个循环,72 ℃ 7 min延伸完毕。所得产物行琼脂糖凝胶电泳,切下带有目的片段的琼脂糖,应用胶回收试剂盒回收PCR产物后进行双酶切,同时酶切载体,将酶切好的目的片段与载体16 ℃链接6 h,转化感受态DH5α,37 ℃培养14 h形成菌落,挑取一定数量菌落行菌液PCR鉴定,阳性者提取质粒酶切鉴定,酶切后阳性克隆测序鉴定。

1.2.2 哺乳动物细胞的转染 细胞培养应用含有10%胎牛血清的DMEM培养基。报告基因活性检测试验:将细胞以1×10^6/mL浓度接种于24孔板中,转染前1 h换新鲜培养基,将0.5 μL脂质体Vigofect与25 μL生理盐水混合,同时将质粒按照pcDNA3.0-Luc或Wild-type bcl-6-3'UTR或Mutated bcl-6-3'UTR报告基因质粒0.25 μg,miR-127 1 μg,pRL-TK 0.1 μg的比例混合于25 μL生理盐水中,室温放置5 min后将两者混合后室温放置15 min,加入24孔板中,每组设3个副孔。37 ℃、5% CO_2条件下培养24 h后收细胞进行荧光素酶活性检测。细胞周期试验:采用2次转染方法进行回复实验,具体转染分组如下:

第1组:miR-control+pcDNA3.0-FLAG;

第2组:miR-127+pcDNA3.0-FLAG;

第3组:miR-127+pcDNA3.0-FLAG-bcl-6。

将HepG2细胞以5×10^6/mL密度接种于6 cm皿中,24 h后进行转染,转染前1 h换新鲜培养基,将miR-127 5 μg混合于200 μL生理盐水中,同时将4 μL脂质体Vigofect混合于200 μL生理盐水中,室温放置5 min后将两者混合后室温再放置15 min,加入6 cm皿。培养24 h后进行回复实验转染,转染方法同前,转染5 μg pcDNA3.0-FLAG-bcl-6于miR-127过表达细胞,继续培养24 h后收细胞一半进行流式细胞周期检测,一般行Western blot检测相关蛋白表达。MiR-127敲低实验转染方法参考过表达转染方法。

1.2.3 流式细胞周期检测 收集细胞,1500 r/min离心10 min,吸弃上清,用含有3%胎牛血清的PBS洗1次,用含上述PBS 30%,乙醇70%混合液-20 ℃固定过夜。取-20 ℃固定的细胞3000 r/min离心1 min,弃上清,再用含有3%胎牛血清的PBS洗细胞两次,弃上清,加入含有RNaseA浓度为1 mg/mL的PBS 0.2 mL,37 ℃水浴30 min,再加入0.3 mL PI置暗处染色,20 min后上机检测。

1.2.4 Western blot检测 转染后48 h收细胞,加入适量RIPA裂解液冰浴裂解细胞30 min,混合等量的SDS缓冲液,煮沸15 min后进行SDS-PAGE检测。将蛋白半干电转于纤维素膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭1 h;加入兔抗人bcl-6抗体(1∶500)、兔抗人Cyclin D1抗体(1∶250)和兔抗人GAPDH抗体(1∶1000),室温平衡摇床轻摇1 h;TBST洗膜3次,加入辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔IgG(1∶2000),室温轻摇1 h;TBST洗膜3次,化

学发光法显色后压片显影。

1.2.5 荧光素酶报告基因活性检测 转染后48 h弃24孔板中的培养基,PBS洗1次,加入100 μL报告基因裂解液(RLB),室温轻摇1 h,收取细胞裂解产物与EP管中,震荡10 min, 4 ℃ 12 000 r/min离心10 min。取20 μL裂解液上清与等量的荧光素酶报告基因底物混合,应用荧光测定仪检测荧光素酶活性。

1.2.6 CCK-8法细胞生长检测 将2次转染后的HepG2细胞以2×10^4/mL细胞数接种于96孔板中,每个孔加入100 μL细胞悬液并设置3个复孔,常规培养。分别于贴壁后、24、48、72、96 h,取一块96孔板,在接种孔中加入10 μL CCK-8试剂;37 ℃、5% CO_2常规培养1 h,测定A_{450}值;以测量时间点为横坐标,A值为纵坐标绘制生长曲线。

2 结果

2.1 bcl-6 3'UTR区报告质粒及其表达载体重组质粒的构建

应用基因克隆技术以乳腺基因组为模板,PCR扩增bcl-6 3'UTR区和CDS编码区序列,琼脂糖电泳分别观察到大小在1100 bp和2100 bp左右的目的片段(图1A),两目的片段回收后分别用*Eco*RⅠ和*Xba*Ⅰ、*Kpn*Ⅰ和*Xho*Ⅰ双酶切后插入各自载体,转化后挑取菌落行菌液PCR,阳性克隆提质粒酶切鉴定,结果显示均可切出大小相符的目的片段(图1B),测序后显示插入片段为目的片段且构象正确(结果略)。

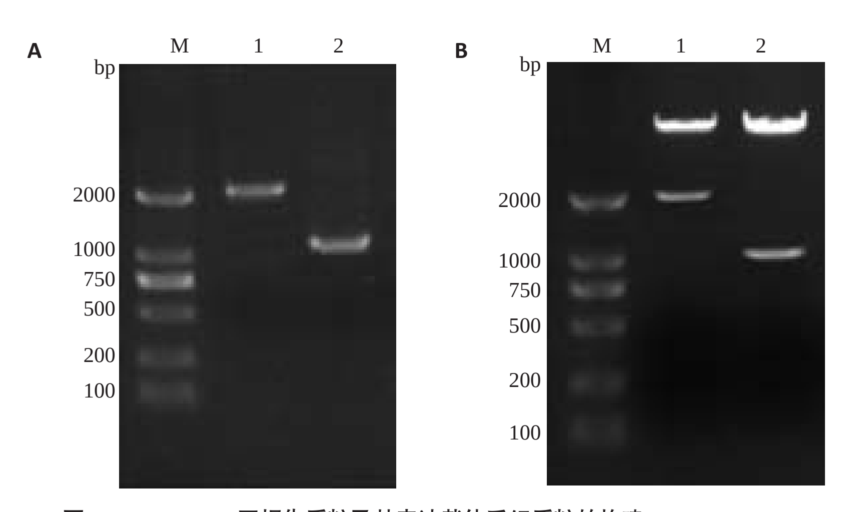


图1 Bcl-6 3'UTR区报告质粒及其表达载体重组质粒的构建

Fig.1 Construction of bcl-6 3'UTR region reporter plasmid and expression vector. M: DNA marker (BM 2000); 1: bcl-6 CDS region; 2: Wild-type bcl-6 3'UTR region. *A*: PCR products; *B*: Enzyme digestion.

2.2 突变体bcl-6 3'UTR区报告质粒的构建

应用重组PCR技术,以构建好的野生型bcl-6 3'UTR质粒为模板,以野生型上游引物和突变体下游引物、野生型下游引物和突变体上游引物PCR分别扩增含有突变位点的上下游片段,纯化后以这两个片段为模板用野生型引物PCR扩增含有突变位点的突变体bcl-6 3'UTR区,琼脂糖电泳回收可观察到大小在1100 bp左右的目的片段(图2A),目的片段回收后用*Eco*RⅠ和*Xba*Ⅰ双酶切后插入各自载体,转化后挑取菌落行菌液PCR,阳性克隆提质粒酶切鉴定(图2B),测序显示突变成功(结果略)。

2.3 重组质粒报告基因活性和表达的鉴定

分别将pcDNA3.0-Luc、野生型bcl-6 3'UTR和突变体bcl-6 3'UTR质粒转染入HEK293T细胞, 37 ℃ 5% CO_2全湿度培养48 h。收取细胞,行荧光素酶报告基因活性检测,结果显示三者的相对荧光素酶活性值分别为1.11±0.108、1.20±0.165、1.15±0.095,具有相似的荧光素酶活性。将pcDNA3.0-FLAG和pcDNA3.0-FLAG-bcl-6转染入HEK293T细胞,37 ℃ 5% CO_2全湿度培养24 h,收细胞行Western blot检测,结果显示:应用FLAG抗体在80 000左右的位置可以看到明显条带,符合bcl-6的大小(图3A)。说明质粒表达正常。

2.4 miR-127对bcl-6 3'UTR区报告基因活性的影响

将miR-127表达载体分别和野生型(WT) bcl-6 3'UTR区或突变体(Mut) bcl-6 3'UTR区报告基因质粒共转人胚肾HEK293T细胞及肝细胞癌HepG2细胞,48 h后收细胞进行荧光素酶活性测定,结果显示:在两种细胞中miR-127均可以明显降低bcl-6 3'UTR区报告基因的活性水平超过50%,对空载体pcNDA3.0-Luc及突变体bcl-6 3'UTR区报告基因的活性并没有明显的降低(图4)。说明bcl-6是miR-127的直接靶基因,这与文献报道相一致。

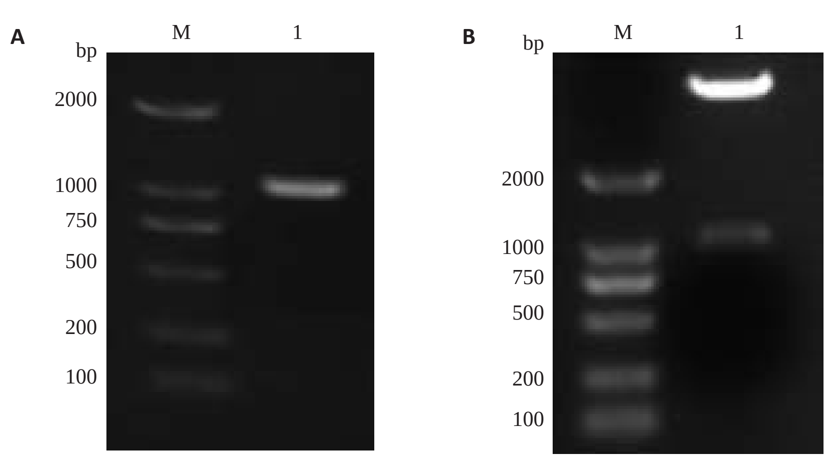


图2 突变体bcl-6 3'UTR区报告质粒的构建

Fig.2 Construction of mutated bcl-6 3'UTR region reporter plasmid. M: DNA marker (BM 2000); 1: Mutated bcl-6 3'UTR region. *A*: PCR product; *B*: Enzyme digestion.

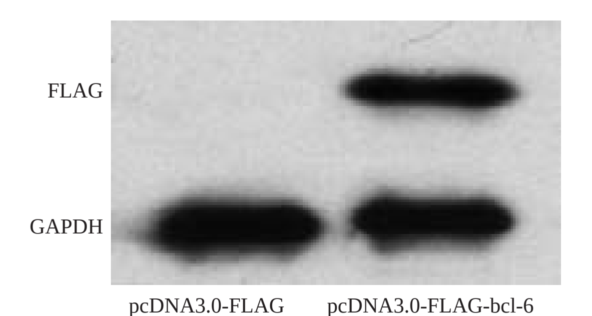


图3 重组质粒表达的鉴定

Fig.3 Expression of bcl-6 protein in HEK293T cells transfected with the recombinant plasmids detected by Western blotting.

2.5 bcl-6表达载体拮抗miR-127对细胞周期的影响

用两次转染的方法分别将miR-127和bcl-6转染入HepG2细胞相应分组，bcl-6转染后24 h收细胞，一部分固定进行流式细胞周期检测，另一部分进行Western blot检测相关蛋白表达水平，结果显示：相比对照组转染miR-127后可以引起细胞的G_0/G_1期阻滞，同时转染miR-127和bcl-6后miR-127引起G_0/G_1期阻滞消失（图5A）。同时Western blot检测发现miR-127可以明显抑制bcl-6表达及Cyclin D1的表达，回复bcl-6蛋白表达后，Cyclin D1的蛋白水平也得到了恢复（图5C）。相反我们发现敲低miR-127可以抑制G_0/G_1其阻滞且升高bcl-6表达及Cyclin D1的表达（图5B，5D）。说明：miR-127可以降低bcl-6的表达进而抑制Cyclin D1的蛋白水平，从而表现出细胞周期G_0/G_1期阻滞；bcl-6表达载体可以回复miR-127引起的bcl-6蛋白水平的降低，具有生物学活性。

2.6 bcl-6表达载体拮抗miR-127对细胞生长的影响

采用二次转染的方式将HepG2分成3组：Empty vector+pcDNA3.0-FLAG、miR-127+pcDNA3.0-FLAG、miR-127+bcl-6。将细胞分别接种于96孔板中，每组设置3个副孔，分别在贴壁后、24、48、72、96 h取一块96孔板，在每个孔中加入10 μL CCK-8溶液，37 ℃ 5% CO_2全湿度培养1 h后测定A_{450}值并绘制生长曲线。结果显示：miR-127可以明显抑制HepG2细胞生长，回复bcl-6表达水平后细胞的生长速度也得到回复。miR-127过表达组与其他两组之间具有统计学意义（$P<0.05$，图6A）。抑制miR-127表达则促进细胞的生长（图6B）。这一结果提示：bcl-6可以拮抗miR-127引起的抑制细胞生长的作用。

3 讨论

bcl-6是Baron等[16]研究B细胞非霍奇金淋巴瘤基因组重组的时候发现和命名的。bcl-6主要表达于生发中心的B细胞和$CD4^+$的T细胞，与生发中心的形成及维持密切相关，研究发现，bcl-6可以抑制T细胞向Th2细胞分化[17]，通过与转录因子STAT3相互作用抑制B细胞分化必须膜分子的表达，进而达到抑制B细胞分化的目的[18]，同时bcl-6还通过抑制P53基因的促凋亡作用进一步达到维持生发中心的作用[19]。由于bcl-6原癌基因的特性，其表达受到严格的调控，当出现染色体异位及点突变都会引起bcl-6启动子的异常激活[20]，从而使bcl-6表达异常增加，引起机体产生癌变。不仅仅在淋巴瘤中检测出bcl-6的异常表达，其还参与多种实体性肿瘤中的发生发展。因此bcl-6成为了药物研究的新靶点，bcl-6表达的调控机制和调控分子被渐渐发现。

miRNA已经成为生物体不可或缺的调控手段，与多种疾病的发生有重要的关系。Saito等[21]首先发现两种染色质修饰药物可以引起癌症细胞miR-127表达的升高进而引起bcl-6的降低，后期的研究也进一步证实，bcl-6为miR-127的直接靶基因[6, 22]。Wu等[23]发现miR-339-5p以bcl-6为靶基因，进而抑制乳腺癌细胞的生长和转移。这仅仅是以bcl-6为靶基因的miRNA研

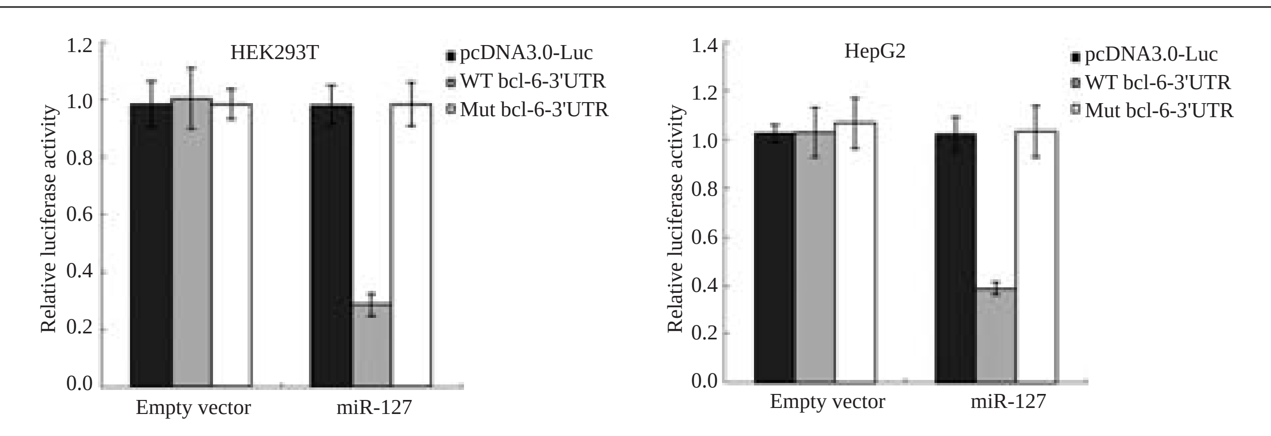


图4 miR-127对bcl-6 3'UTR区报告基因活性的影响

Fig.4 Effect of miR-127 on bcl-6 3 'UTR region reporter plasmid.

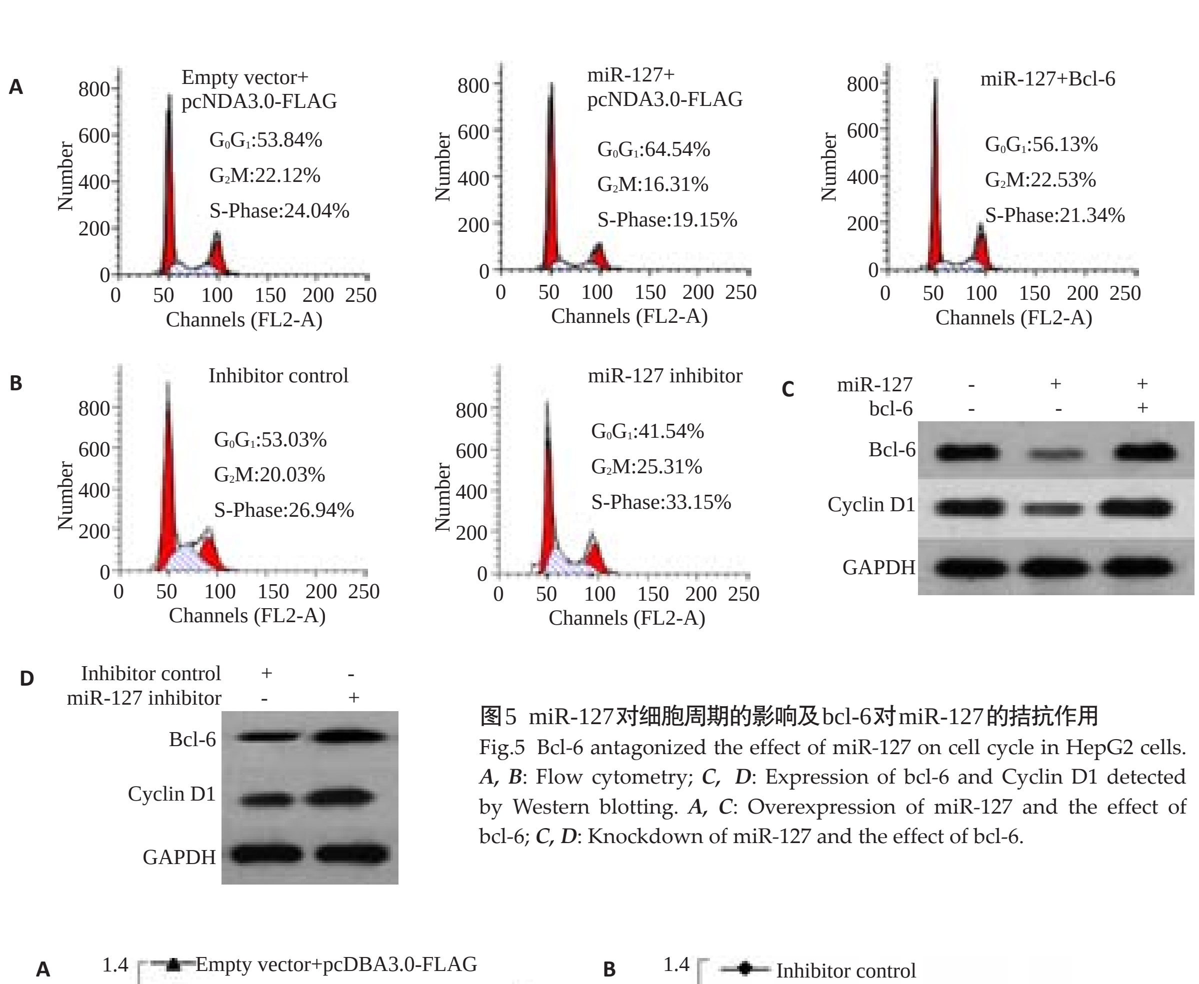


图5 miR-127对细胞周期的影响及bcl-6对miR-127的拮抗作用

Fig.5 Bcl-6 antagonized the effect of miR-127 on cell cycle in HepG2 cells. ***A, B***: Flow cytometry; ***C, D***: Expression of bcl-6 and Cyclin D1 detected by Western blotting. ***A, C***: Overexpression of miR-127 and the effect of bcl-6; ***C, D***: Knockdown of miR-127 and the effect of bcl-6.

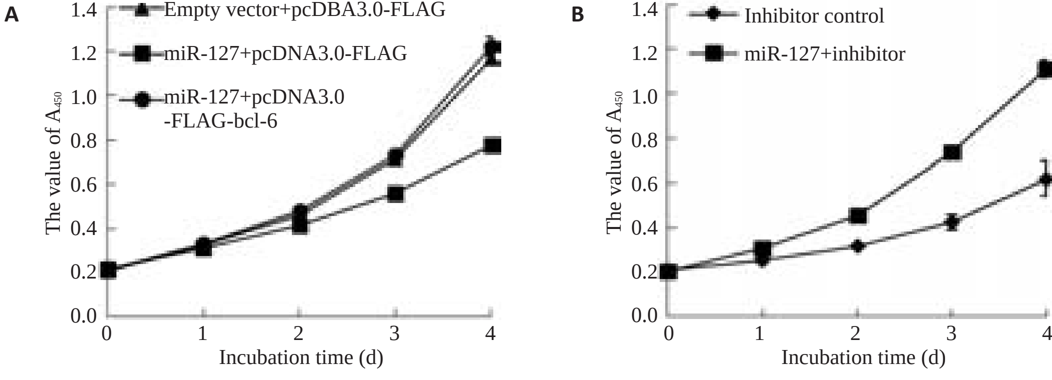


图6 miR-127对细胞生长的影响

Fig.6 Growth curves of HepG2 cells with miR-127 overexpression (*A*) and knockdown (*B*) and transfected with bcl-6 vectors.

究的开始。

在miRNA研究中,目的基因3'UTR区报告质粒的构建及荧光素酶活性检测是判定miRNA作用靶基因的直接证据,我们在实验中成功构建了bcl-6基因的3'UTR区报告质粒,与miR-127共转发现活性明显受到抑制,这与前期研究报道相一致,为后期进一步筛选以bcl-6为直接靶点的miRNA奠定了实验基础。回复实验的目的是为了在敲低实验中防止出现脱靶效应,在抑制基因表达实验中被用来证实该siRNA的特异性。由于miRNA与siRNA同样是以降低基因表达而发挥其功能,所以回复实验是不可或缺的。我们构建了bcl-6 CDS序列表达载体,研究发现其可以逆转miR-127引起的细胞周期的改变及细胞生长的改变,这说明bcl-6质粒具有生物学活性。为后期检测筛选的miRNA功能试验奠定良好的实验基础

参考文献:

[1] 耿万友, 侯 睿, 孙树民, 等. 原癌基因bcl-6研究进展[J]. 动物医学进展, 2013, 4(3): 110-3.

[2] Baron BW, Hyjek E, Gladstone B, et al. PDCD2, a protein whose expression is repressed by BCL6, induces apoptosis in human cells by activation of the caspase cascade[J]. Blood Cells Mol Dis, 2010, 45(2): 169-75.

[3] Crotty S, Johnston RJ, Schoenberger SP. Effectors and memories: bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation[J]. Nat Immunol, 2010, 11(2): 114-20.

[4] Sawant DV, Wu H, Yao W, et al. The transcriptional repressor Bcl6 controls the stability of regulatory T cells by intrinsic and extrinsic pathways[J]. Immunology, 2015, 145(1): 11-23.

[5] Mathew R, Mao AP, Chiang AH, et al. A negative feedback loop mediated by the Bcl6-cullin 3 complex limits Tfh cell differentiation [J]. J Exp Med, 2014, 211(6): 1137-51.

[6] Chen J, Wang M, Guo M, et al. miR-127 regulates cell proliferation and senescence by targeting BCL6[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80266.

[7] Phan RT, Saito M, Basso K, et al. BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells[J]. Nat Immunol, 2005, 6(10): 1054-60.

[8] Ranuncolo SM, Polo JM, Melnick A. BCL6 represses CHEK1 and suppresses DNA damage pathways in normal and malignant B-cells [J]. Blood Cells Mol Dis, 2008, 41(1): 95-9.

[9] Wu Q, Liu X, Yan H, et al. B-cell lymphoma 6 protein stimulates oncogenicity of human breast cancer cells[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 418.

[10] Walker SR, Liu S, Xiang M, et al. The transcriptional modulator BCL6 as a molecular target for breast cancer therapy[J]. Oncogene, 2015, 34(9): 1073-82.

[11] Ruggieri S, Tamma R, Marzullo A, et al. Translocation of the proto-oncogene bcl-6 in human glioblastoma multiforme[J]. Cancer Lett, 2014, 353(1): 41-51.

[12] Sena P, Mariani F, Benincasa M, et al. Morphological and quantitative analysis of BCL6 expression in human colorectal carcinogenesis[J]. Oncol Rep, 2014, 31(1): 103-10.

[13] Liang PI, Li CF, Chen LT, et al. BCL6 overexpression is associated with decreased p19 ARF expression and confers an Independent prognosticator in gallbladder carcinoma[J]. Tumour Biol, 2014, 35 (2): 1417-26.

[14] Tunyaplin C, Shaffer AL, Angelin-Duclos CD, et al. Direct repression of prdm1 by bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation [J]. J Immunol, 2004, 173(2): 1158-65.

[15] Feng C, Jin J, Zou Q, et al. Interleukin-21 inhibits humoral response to an HIV DNA vaccine by enhancing bcl-6 and Pax-5 expression[J]. Viral Immunol, 2012, 25(2): 131-40.

[16] Baron BW, Nucifora G, Mccabe N, et al. Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3; 14) (q27; q32) and t(3; 22)(q27; q11) in B-cell lymphomas[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(11): 5262-6.

[17] Kusam S, Toney LM, Sato H, et al. Inhibition of Th2 differentiation and GATA-3 expression by BCL-6[J]. J Immunol, 2003, 170(5): 2435-41.

[18] Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, et al. IL-6 triggers IL-21 production by human $CD4^+$ T cells to drive STAT3-dependent plasma cell differentiation in B cells[J]. Immunol Cell Biol, 2012, 90(8): 802-11.

[19] Ranuncolo SM, Wang L, Polo JM, et al. BCL6-mediated attenuation of DNA damage sensing triggers growth arrest and senescence through a p53-dependent pathway in a cell context-dependent manner[J]. J Biol Chem, 2008, 283(33): 22565-72.

[20] Artiga MJ, Sáez AI, Romero C, et al. A short mutational hot spot in the first intron of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas[J]. Am J Pathol, 2002, 160(4): 1371-80.

[21] Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells[J]. Cancer Cell, 2006, 9(6): 435-43.

[22] Zhao X, Duan Z, Liu X, et al. MicroRNA-127 is downregulated by Tudor-SN protein and contributes to metastasis and proliferation in breast cancer cell line MDA-MB-231 [J]. Anat Rec (Hoboken), 2013, 296(12): 1842-9.

[23] Wu ZS, Wu Q, Wang CQ, et al. MiR-339-5p inhibits breast cancer cell migration and invasion *in vitro* and May be a potential biomarker for breast cancer prognosis[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 542.

(编辑:吴锦雅)